



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

Human MIR4999 qPCR Primer Pair

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|--------------------------------|------|
| QH85897S | Human MIR4999 qPCR Primer Pair | 200次 |

产品简介:

- Human MIR4999 qPCR Primer Pair, 即人MIR4999 qPCR引物对, 主要用于基于SYBR Green的qPCR、One-Step qRT-PCR或semi-quantitative PCR。本引物为预先设计、经过qPCR验证、预混的引物对。
- qPCR (Quantitative PCR)即定量PCR, 也称实时荧光定量PCR或实时定量PCR (Real-time quantitative PCR)、实时PCR (Real-time PCR), 是一种在DNA扩增反应过程中, 以荧光定量测定每个聚合酶链式反应(PCR)循环后产物总量的方法。qPCR常用的两种方法是SYBR Green等荧光染料法和探针法。SYBR Green等荧光染料法是使用带有荧光的、非特异的DNA结合染料SYBR Green等以检测PCR过程中积累的PCR扩增产物; 而探针法(Probe method), 也被称为TaqMan探针法, 不使用荧光染料, 而采用荧光基团和淬灭基团(Quencher)标记的DNA探针靶向拟通过PCR检测的目标序列[1,2]。
- 对于SYBR Green等染料法, 引物至关重要。本系列引物产品采用碧云天开发的引物设计算法, 优化了序列并经过验证, 特异性佳, 扩增效率高, 引物二聚体形成发生率低, qPCR数据可靠; 本系列引物对一般都跨外显子(Span exon junctions), 避免了对基因组DNA (gDNA)的扩增[3,4]; 本系列的引物产品非常丰富, 几乎包含了所有人和小鼠的基因; 引物的Tm值约60°C, 大多数扩增产物(Amplicon)的长度约90-160bp。同时碧云天还提供针对各个信号通路的引物组合(Primer Panel/Primer Array)。
- 本产品为预混冻干粉, 每管含正向引物(Forward primer, 也称上游引物)和反向引物(Reverse primer, 也称下游引物)各1nmol, 共2nmol, 不含核酸酶(Nuclease-free), 只需加入400μl超纯水溶解成2.5μM each, 即可使用。按20μl或25μl体系使用2μl引物, 本产品每管可以用于200次qPCR实验。

| Gene Information | |
|---------------------|--|
| Gene Name | microRNA 4999 |
| Gene Symbol | MIR4999 |
| Synonyms | mir-4999 |
| Organism | Human |
| Gene ID | 100847049 |
| UniProt ID | - |
| Main Accession No. | MI0017865 |
| Other Accession No. | MIMAT0021017 |
| Map Location | 19p13.2 |
| Pathway | - |
| Gene Summary | microRNAs (miRNAs) are short (20-24 nt) non-coding RNAs that are involved in post-transcriptional regulation of gene expression in multicellular organisms by affecting both the stability and translation of mRNAs. miRNAs are transcribed by RNA polymerase II as part of capped and polyadenylated primary transcripts (pri-miRNAs) that can be either protein-coding or non-coding. The primary transcript is cleaved by the Drosha ribonuclease III enzyme to produce an approximately 70-nt stem-loop precursor miRNA (pre-miRNA), which is further cleaved by the cytoplasmic Dicer ribonuclease to generate the mature miRNA and antisense miRNA star (miRNA*) products. The mature miRNA is incorporated into a RNA-induced silencing complex (RISC), which recognizes target mRNAs through imperfect base pairing with the miRNA and most commonly results in translational inhibition or destabilization of the target mRNA. The RefSeq represents the predicted microRNA stem-loop. [provided by RefSeq, Sep 2009] |

| Amplicon Information | |
|----------------------|---|
| Amplicon Length (bp) | - |
| NCBI mRNA ID | - |

| | |
|-----------------------|---|
| NCBI Protein ID | - |
| Ensembl Transcript ID | - |
| Ensembl Gene ID | - |
| Ensembl mRNA ID | - |

产品包装:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|--------------------------------|------------|
| QH85897S | Human MIR4999 qPCR Primer Pair | 1nmol each |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件:

-20°C保存。建议复溶后进行适当分装，避免反复冻融。

注意事项:

- PCR扩增产物的长度可能会因基因转录后存在多种剪接形式而有所差异。
- 虽然本系列引物产品的特异性非常好，但仍建议进行熔解曲线(Melt curve)分析以确定扩增反应的特异性。如果只有一个熔解曲线峰(对应的退火温度即双链DNA产物的T_m值)，说明只有一种单一产物；如果熔解曲线出现双峰、多峰或杂峰峰，可能是引物二聚体或非特异性扩增、存在基因组DNA污染、试剂及环境被污染等。建议设置不含模板的对照(No template control, NTC)，即反应体系中包含除模板以外的所有反应组分，根据样品孔和无模板对照孔熔解曲线的差异，可判断是否存在引物二聚体或其它的非特异性扩增。
- 若反应体系存在扩增产物污染，推荐使用防污染型qPCR Mix。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法:

1. PCR反应体系的设置:

- a. 开启本产品前，3000-8000×g离心1分钟，以防开盖时引物干粉散失。每管加入400μl超纯水，先盖好盖子颠倒混匀数次，然后离心机快速离心几秒，开盖后再轻轻吹打混匀，即得400μl 2.5μM each的Primer Mix。超纯水推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。
- b. 融解并混匀PCR反应所需的各种溶液。SYBR Green qPCR Mix需完全融解并混匀后置于冰浴上或冰盒内。推荐使用BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X) (D7260/D7262/D7265)、BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (D7268)、BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, 防污染型) (D7501/D7503/D7507)或BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (防污染型) (D7509)。
- c. 参考下表在室温或冰浴上设置PCR反应体系，以96孔板和BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X)为例。

| Reagent | Volume for One PCR Reaction |
|--------------------------|-----------------------------|
| SYBR Green qPCR Mix (2X) | 10μl |
| Primer Mix (2.5μM each) | 2μl |
| Template DNA | 2μl |
| RNase-Free Water | 6μl |
| Total Volume | 20μl |

注1: 通常引物的终浓度为0.2-0.5μM each时可获得良好的检测效果，也可根据情况在0.1-1.0μM each范围内调整引物的终浓度。

注2: 通常DNA模板的量以1-10ng cDNA为参考用量。因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，如有必要，可加大模板用量或对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。RT-PCR反应得到的cDNA直接作为模板时，其添加量不要超过PCR反应总体积的10%。

注3: 96孔板的推荐反应体系为20μl，也可以根据实际实验需求，按比例扩大或缩小反应体系。

注4: 建议设置不加模板的阴性对照组。

- d. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。推荐使用BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式, 2500rpm) (E6758)进行快速离心。
- e. 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上，开始定量PCR反应。

2. PCR反应程序:

在Real-time PCR反应前进行模板的预变性，通常设定为95°C 2分钟，复杂或高GC模板适当延长时间至5-10分钟。本程序是以ABI QuantStudio™ 6 Flex荧光定量PCR仪为例:

- a. 预变性: 95°C 2分钟;
- b. 变性: 95°C 15秒;
- c. 退火/延伸: 60°C 15-30秒;
- d. 重复步骤b和步骤c, 总共40个循环;

e. 熔解曲线分析(可选): 95°C 15秒, 60°C 15秒, 95°C 15秒;

f. 使用荧光定量PCR仪提供的软件分析结果。

注: 以上举例为常规qPCR反应系统, 仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异, 需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件, 并根据比例放大或缩小反应体系。上述为两步法qPCR, 如果采用三步法qPCR, 只需在退火/延伸后加一步72°C 30秒, 随后重复步骤b、c及增加的这一步骤共40个循环即可。

参考文献:

1. Marilynn R Fairfax, Hossein Salimnia. Molecular Diagnostics. 2010. Pages 3-14.
2. Cao H, Shockey JM. J Agric Food Chem. 2012. 60(50):12296-303.
3. Thornton B, Basu C. Methods Mol Biol. 2015. 1275:173-9.
4. Bustin SA, Mueller R, Nolan T. Methods Mol Biol. 2020. 2065:5-22.
5. Kozera B, Rapacz M. J Appl Genet. 2013. 54(4):391-406.
6. da Conceição Braga L, Gonçalves BÔP, Coelho PL, et al. Acta Histochem. 2022. 124(1):151821.
7. Laurell H, Iacovoni JS, Abot A, Svec D, Maoret JJ, et al. Nucleic Acids Res. 2012. 40(7):e51.

相关产品:

1. 人内参引物对:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---------|---------------------------------|----------------|
| QH00001 | Human ACTB qPCR Primer Pair | 200/1000/5000次 |
| QH00005 | Human B2M qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00009 | Human GAPDH qPCR Primer Pair | 200/1000/5000次 |
| QH00013 | Human GUSB qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00017 | Human HCK qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00021 | Human HMBS qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00025 | Human HPRT1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00029 | Human HSP90AA1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00033 | Human HSP90AB1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00037 | Human LDHA qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00041 | Human NONO qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00045 | Human PGK1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00049 | Human PPIA qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00053 | Human RPL30 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00057 | Human RPLP0 qPCR Primer Pair | 200/1000/5000次 |
| QH00061 | Human RPLP1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00065 | Human SDHA qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00069 | Human TBP qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00073 | Human TFRC qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00077 | Human YWHAZ qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00081 | Human PPIH qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00085 | Human RPL13A qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QH00089 | Human TUBB qPCR Primer Pair | 200/1000/5000次 |
| QH00093 | Human RNA18S5 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |

注: 推荐使用GAPDH、RPLP0、ACTB、TUBB和B2M作为内参, 但如果这三者无法满足实验需求, 可以尝试使用HPRT1或RNA18S5作为内参。为达到满意的实验效果, 上述引物均可尝试使用[5-6]。

2. 小鼠内参引物对:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---------|---------------------------------|----------------|
| QM00002 | Mouse Actb qPCR Primer Pair | 200/1000/5000次 |
| QM00006 | Mouse Rplp0 qPCR Primer Pair | 200/1000/5000次 |
| QM00010 | Mouse B2m qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00014 | Mouse Gapdh qPCR Primer Pair | 200/1000/5000次 |
| QM00018 | Mouse Hck qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00022 | Mouse Hmbs qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00026 | Mouse Hprt qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00030 | Mouse Hsp90ab1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |

| | | |
|---------|---------------------------------|----------------|
| QM00034 | Mouse Hsp90aa1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00038 | Mouse Ldha qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00042 | Mouse Pgk1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00046 | Mouse Rn18s qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00050 | Mouse Rpl30 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00054 | Mouse Tbp qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00058 | Mouse Tfr3 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00062 | Mouse Rpl13a qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00066 | Mouse Tubb4a qPCR Primer Pair | 200/1000/5000次 |
| QM00070 | Mouse Ywhaz qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00074 | Mouse Nono qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00078 | Mouse Rplp1 qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00082 | Mouse Ppih qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00086 | Mouse Sdha qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00090 | Mouse Gusb qPCR Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00094 | Mouse Ppia qPCR Primer Pair | 200/1000次 |

注：推荐使用Gapdh、Rplp0、Actb、Tubb和B2m作为内参，但如果这三者无法满足实验需求，可以尝试使用Hprt1或Rn18s作为内参。为达到满意的实验效果，上述引物均可尝试使用[5-6]。

3. 基因组DNA (gDNA)引物对(用于gDNA污染检测):

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---------|------------------------|-----------|
| QH00101 | Human HGDC Primer Pair | 200/1000次 |
| QM00098 | Mouse MGDC Primer Pair | 200/1000次 |

注：To obtain reliable qPCR data, genomic DNA contamination should be tested by qPCR with genomic DNA contamination primer pair [7]。

4. SYBR Green qPCR Mix及耗材:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---------------|--|---------------|
| D7260 | BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X) | 1/5/25ml |
| D7262 | BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX) | 1/5/25ml |
| D7265 | BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX) | 1/5/25ml |
| D7268 | BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit | 100/500次 |
| D7501 | BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, 防污染型) | 1/5/25ml |
| D7503 | BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX, 防污染型) | 1/5/25ml |
| D7507 | BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX, 防污染型) | 1/5/25ml |
| D7509 | BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (防污染型) | 100/500次 |
| FASA011-1pc | BeyoGold™封板膜刮板 | 1个/袋 |
| FSF002 | 荧光定量PCR用封板膜(ABI分装) | 20片/包装 |
| FSF035-100pcs | BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型) | 100片/包装 |
| FSF039-20pcs | BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装) | 20片/包装 |
| FSF039-100pcs | BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装) | 100片/包装 |
| FTUB325-1box | BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明) | 125排/盒 |
| FTUB325-10bxs | BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明) | 125排/盒, 10盒/箱 |
| FTUB333 | 荧光定量PCR用96孔板(ABI原装) | 20片/包装 |
| FTUB384 | 荧光定量PCR用384孔板(ABI分装) | 20片/包装 |
| FTUB335-1box | BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明) | 10个/盒 |
| FTUB335-5bxs | BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明) | 10个/盒, 5盒/箱 |
| FTUB337-1box | BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明) | 10个/盒 |
| FTUB337-5bxs | BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明) | 10个/盒, 5盒/箱 |